

N-Acyl Homoserine Lactones sebagai Signal Quorum Sensing untuk Meningkatkan Efektifitas Bakteri Fosfat

N-Acyl Homoserine Lactones as Quorum Sensing Signal to Enhance Phosphate Bacteria Effectiveness

Tamad

Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jenderal Soedirman
Jl. dr. Soeparno Karangwangkal Purwokerto 53123

Diterima September 2013 disetujui untuk diterbitkan Januari 2014

Abstract

Phosphate bacteria (PB) are able to release P-adsorption by soil. PB effectiveness in releasing adsorption P controlled by *quorum sensing* (QS) signal. PB produces a QS signal as N-acyl homoserine lactones (N-HSL). The aim of this study are to determine the type of N-HSL as QS signal of PB (*Pseudomonas trivialis*, *P. putida* and *P. fluorescens*) and find the source of N-HSL from root extracts of some plants (rice, corn, bamboo, banana and peanuts). Analysis of N-HSL using HPLC (Hitachi UV-VIS detector L-2420), L-2200 autosampler (20 mL), L-2130 pump and column C OOF-4250-CO/10 μ m LaChrom Ultra 18 (2 μ m) 100 A 150 x 4.60 mm 10 m KPOW 490065-1 (Phenomenex), temperature 60° C, flow rate of 0.9 mL/minute and a gradient of 30-100 % in 1.0 minutes. Standard N-HSL is C₄-HSL, 6, 8, 10, 12 homoserine lactones (Sigma-Aldrich, Germany) was dissolved in acetonitrile (Merck, India) with a concentration of 50 mM. P-dissolved by PB determined by staining NVM and a spectrophotometer at a wavelength of 413 nm. PB population is determined by the OD (*optical density*) at a wavelength of 600 nm. PB populations on medium Pikovskaya influenced by PB isolates, the type of P sources and duration of incubation. N-HSL generated by PB highest is Butanoyl (C₄) homoserine lactones. PB isolates 9 and Ca-phosphate sources produce N-HSL most. Root extract of rice, corn, bamboo, bananas and peanuts can be a source of N-HSL. Soluble phosphorus from medium Pikovskaya influenced by the type of PB isolates and source of P.

Key Words: Autoinducer, P-adsorption, P-release, Root Exudate

Abstrak

Bakteri Fosfat (BF) mampu melepaskan P-terjerap tanah. Efektivitas BF dalam melepaskan P-terjerap dikontrol oleh signal *quorum sensing* (QS). BF menghasilkan signal QS sebagai N-acyl homoserine lakton (N-HSL). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan jenis N-HSL sebagai signal QS BF (*Pseudomonas trivialis*, *P. putida* dan *P. fluorescens*) dan menemukan sumber N-HSL dari ekstrak akar beberapa tanaman (padi, jagung, bambu, pisang dan kacang tanah). Analisis N-HSL menggunakan HPLC (Hitachi UV-VIS detektor L-2420), L-2200 autosampler (20 mL), L-2130 pompa dan kolom C OOF-4250-CO/10 μ m LaChrom Ultra 18 (2 μ m) 100 A 150 x 4.60 mm 10 m KPOW 490065-1 (Phenomenex), suhu 60 ° C, laju 0,9 mL /menit dan gradien dari 30-100 % mengalir dalam 1,0 menit. Standar N-HSL adalah C₄-HSL, 6, 8, 10, 12 homoserine lakton (Sigma-Aldrich, Jerman) dilarutkan dalam asetonitril (Merck, India) dengan konsentrasi 50 mM. P-terlepaskan oleh BF ditentukan dengan pewarnaan NVM dan spektrofotometer pada panjang gelombang 413 nm. Populasi BF ditentukan oleh OD (*Optical Density*) di panjang gelombang 600 nm. Populasi BF pada media Pikovskaya dipengaruhi oleh jenis isolat BF, jenis sumber P dan lama waktu inkubasi. N-HSL dihasilkan oleh BF tertinggi adalah Butanoyl (C₄) homoserine lakton. BF isolat 9 dan sumber Ca-fosfat menghasilkan N-HSL paling banyak. Ekstrak akar padi, jagung, bambu, pisang dan kacang tanah dapat menjadi sumber N-HSL. Fosfor larut dari media Pikovskaya dipengaruhi oleh jenis isolat BF dan sumber P.

Kata Kunci: Autoinducer, P-terjerap, P-terlepas, Eksudat Akar

Pendahuluan

Pemberian pupuk fosfat (P) yang banyak di tanah tidak menjamin ketersediaan P bagi tanaman, karena efisiensi P yang rendah, 10-20% (Hawkes *et al.*, 2007). Salah satu usaha untuk

meningkatkan ketersediaan P tanah ialah dengan memanfaatkan bakteri pelarut fosfat (BF). BF mampu melepaskan P-terjerap tanah (Mehrvaz dan Chaichi, 2008). BF mampu melepaskan P-terjerap karena menghasilkan asam organik dengan urutan

sitrat > malat > asetat > oksalat > laktat, beraktifitas fosfatase dan fitase, dan bermuatan permukaan (Mehrvarz dan Chaichi, 2008). Tamad (2012) mendapatkan BF isolat 1 (*Pseudomonas trivialis*), 5 (*P. putida*), dan 9 (*P. fluorescens*) mampu melarutkan P dari BF, CaP, AIP, dan FeP pada media Pikovskaya. *Pseudomonas* sp. juga mensekresikan metabolit yang berfungsi sebagai *biocontrol* (Susilowati *et al.*, 2011).

Proses biokimia yang mengatur tingkah laku mikrobial yang tergantung kepadatan populasi melalui molekul signal *quorum sensing* (QS) pada bakteri disebut *autoinducer* (Teplitski *et al.*, 2011). Umumnya bakteri Gram negatif menghasilkan signal QS berupa N-acyl-homoserine lactones (N-HSL) (Ward *et al.*, 2001). Molekul turunan N-HSL adalah N-butanoyl (C₄), N-hexanoyl (C₆), N-octanoyl (C₈), N-decanoyl (C₁₀), dan N-dodecanoyl (C₁₂) homoserine lactones (Rani *et al.*, 2011). Tistama *et al.* (2012) menyatakan bahwa keefektifan BF, bakteri Gram negatif, dapat ditingkatkan dengan menentukan jenis dan konsentrasi N-HSL untuk ditambahkan ke inokulum BF. Akar tanaman mensekresikan sebagian metabolitnya berupa senyawa organik kompleks termasuk *autoinducer*.

Berdasarkan latar belakang, permasalahan yang ingin dicarikan solusinya ialah apa jenis N-HSL sebagai signal QS dari BF (*Pseudomonas trivialis*, *P. putida* dan *P. fluorescens*) yang efektif melepaskan P-terjerap, untuk merakit inokulum BF. Selain itu, ialah mencari kemungkinan sumber N-HSL sebagai signal QS dari BF dari ekstrak akar beberapa tanaman.

Materi dan Metode

Penentuan Jenis N-HSL sebagai Signal QS dari BF. Biakan tiga isolat BF (*Pseudomonas trivialis*, *P. putida*, dan *P. fluorescens*) dipanen pada fase stationer. Pelet BF dan sampel akar (padi, jagung, bambu, pisang dan kacang tanah) diekstrak dengan kloroform 4 %, kemudian dilarutkan dalam acetonitril (Rani *et al.*, 2011). Analisis N-HSL dari BF dan akar tanaman menggunakan HPLC (Lab. Riset UNSOED) (Hitachi UV-VIS detektor L-2420), *autosampler* L-2200 (20 µL), *pump* L-2130, dan kolom OOF-4250-CO/10 µm LaChrom Ultra C 18 (2 µm) 100 A 150 x 4.60 mm 10 m

KPOW 490065-1 (Phenomenex) dengan suhu 60°C, laju alir 0,9 mL/menit, dan gradien 30-100% dalam 1,0 menit. Standar N-HS adalah N-butanoyl/C₄-HSL, N-hexanoyl/C₆-HSL, N-octanoyl/C₈-HSL, N-decanoyl/C₁₀-HSL, dan N-dodecanoyl/C₁₂-HSL homoserine lactones (Sigma-Aldrich, Germany) dilarutkan dalam acetonitrile (Merck, India) dengan konsentrasi 50 mM (Li *et al.*, 2006). Jenis dan konsentrasi N-HSL sampel ditentukan dengan membandingkan *time retention* dan luas area *peak* N-HSL standar (Li *et al.*, 2006; Rani *et al.*, 2001).

Penentuan Populasi BF dan Fosfor Larut. Populasi BF ditentukan menggunakan metode *optical density* (OD) pada panjang gelombang 600 nm (Hosseinkhani *et al.*, 2009). Kemampuan BF dalam melepaskan P-terjerap tanah didekati dengan kemampuan BF dalam melarutkan P pada Pikovskaya dengan sumber P ialah Ca₃(PO₄)₂, AlPO₄ (Sigma, USA), FePO₄ (Aldrich, USA), pNPP (para-nitrophenyl phosphate) atau Na-fitat. P-terlarut ditentukan dengan pewarnaan NVM (amonium vanado molibdat/warna *orange*), dan pembacaan dengan Spektrofotometer (UV-VIS UVmin-1240 Shimadzu) pada panjang gelombang 413 nm (BPT, 2005).

Hasil dan Pembahasan

Signal Quorum Sensing Bakteri Fosfat. Signal QS penting agar BF mampu mengekspresikan daya larut P. Jenis senyawa N-HSL yang dihasilkan oleh BF terbanyak ialah BHL dengan konsentrasi 10-15 kali lebih banyak dibanding jenis lainnya, dengan urutan BHL > HHL > OHL > DHL > dDHL (Gambar 1). Secara relatif *Pseudomonas fluorescens* menghasilkan N-HSL lebih banyak dibanding *Pseudomonas putida* dan *Pseudomonas* Kata Kunci: Autoinducer, P-terjerap, P-terlepas, Eksudat Akar **Pendahuluan** Pemberian pupuk fosfat (P) yang banyak di tanah tidak menjamin ketersediaan P bagi tanaman, karena efisiensi P yang rendah, 10-20% (Hawkes *et al.*, 2007). Salah satu usaha untuk meningkatkan ketersediaan P tanah ialah N-HSL lebih banyak dibanding *Pseudomonas putida* dan *Pseudomonas trivialis* (Gambar 2). Demikian juga, sumber P berpengaruh terhadap produksi N-HSL oleh BF dengan urutan CaP > pNPP > FeP > AIP > NaFitat

(Gambar 3). *Pseudomonas fluorescens* yang ditumbuhkan pada Pikovskaya dengan sumber CaP menghasilkan Butanoyl-HSL terbanyak.

Populasi dan Daya Larut P dari BF. Populasi BF akan berpengaruh terhadap kemampuannya melarutkan P. Populasi BF dipengaruhi oleh jenis isolat BF, yaitu populasi *Pseudomonas fluorescens* lebih banyak 10 sampai 30 kali dibanding *Pseudomonas putida* dan *Pseudomonas trivialis* (Gambar 4a). Populasi BF meningkat drastis pada sumber CaP. Urutan populasi BF pengaruh sumber P ialah $\text{CaP} > \text{AIP} > \text{FeP} > \text{pNPP} > \text{NaFitat}$ (Gambar 4b). Penambahan lama inkubasi dari 5 menjadi 10 hari menurunkan populasi BF empat kali (Gambar 4c). Fosfor larut dari medium Pikovskaya dipengaruhi oleh jenis isolat BF, yaitu *Pseudomonas fluorescens* dua kali lebih banyak dibanding *Pseudomonas putida* dan *Pseudomonas trivialis* (Gambar 5a). Fosfor terlarut pada CaP dua kali lebih banyak dibanding sumber P lainnya karena BF menghasilkan N-HSL terbanyak. Urutan P-larut oleh BF dari sumber P ialah $\text{CaP} > \text{AIP} > \text{FeP} > \text{pNPP} > \text{NaFitat}$ (Gambar 5b). *Pseudomonas fluorescens* pada sumber CaP merupakan kombinasi terbaik untuk menghasilkan N-HSL, populasi dan P-larut tertinggi.

Potensi Akar Tanaman Sumber QS. Akar tanaman mensekresikan senyawa bermanfaat bagi mikrobia, termasuk N-HSL (Gambar 7). Ekstrak akar padi, jagung, pisang, bambu dan kacang tanah menghasilkan jenis dan jumlah N-HSL relatif tidak berbeda (Gambar 6). Ekstrak akar tanaman menghasilkan *peak* kromatogram yang lebih variatif dibanding BF (Gambar 8). Diduga ekstrak akar tanaman mengandung senyawa yang lebih variatif dibanding BF. Ekstrak akar tanaman padi, jagung, bambu, pisang dan kacang tanah dapat dijadikan sebagai sumber N-HSL.

Kemampuan bakteri fosfat melarutkan P sejalan dengan populasi dan N-HSL yang disekresikannya. *Pseudomonas fluorescens* pada sumber CaP mampu melarutkan P terbanyak. Hal tersebut didukung oleh populasi BF dengan menghasilkan signal QS N-butanoyl/C₄-HSL terbanyak. Ekstrak akar tanaman dapat dijadikan sumber N-HSL. Hal ini disebabkan akar tanaman mensekresikan sebagian metabolitnya melalui akar, antara lain adalah N-HSL (Rashid *et al.*, 2004). QS berfungsi sebagai

pengatur populasi, ekspresi gen dan pengatur perilaku sel mikrobia dalam lingkungan tertentu (Camara *et al.*, 2002). Waktu generasi mikroba dipengaruhi oleh jenis mikrobia, medium tumbuh dan faktor lingkungan penting. Setelah fase log populasi mikroba menurun karena pada fase stationer akibat kepadatan sel yang tinggi, kekurangan nutrisi dan penumpukan hasil limbah, sedangkan pada fase kematian mikrobia kehilangan daya memperbanyak diri (Thiel, 1999). Mekanisme mikrobia pelarutan fosfat oleh BF melalui produksi: 1) asam organik (sitrat, malat, oksalat, glutamat, laktat, suksinat, isovalerat, isobutirat, glukonat, fumarat, asetat), ion H⁺ dan HCO₃⁻, 2) polisakarida dan 3) enzim fitase dan fosfatase (terutama fosfatase asam) (Victoria *et al.*, 2009). N-HSL disintesis dari protein pembawa acyl dengan S-adenosil-metionin oleh enzim N-HSL sintase, diteruskan oleh proses acylasi dan laktonisasi menghasilkan protein karier holo-acyl dan 5'-metil-tioadenosin, selanjutnya membentuk N-HSL (Watson *et al.*, 2002).

QS N-butanoyl/C₄-HSL terbanyak. Ekstrak akar tanaman dapat dijadikan sumber N-HSL. Hal ini disebabkan akar tanaman mensekresikan sebagian metabolitnya melalui akar, antara lain adalah N-HSL (Rashid *et al.*, 2004). QS berfungsi sebagai pengatur populasi, ekspresi gen dan pengatur perilaku sel mikrobia dalam lingkungan tertentu (Camara *et al.*, 2002). Waktu generasi mikroba dipengaruhi oleh jenis mikrobia, medium tumbuh dan faktor lingkungan penting. Setelah fase log populasi mikroba menurun karena pada fase stationer akibat kepadatan sel yang tinggi, kekurangan nutrisi dan penumpukan hasil limbah, sedangkan pada fase kematian mikrobia kehilangan daya memperbanyak diri (Thiel, 1999). Mekanisme mikrobia pelarutan fosfat oleh BF melalui produksi: 1) asam organik (sitrat, malat, oksalat, glutamat, laktat, suksinat, isovalerat, isobutirat, glukonat, fumarat, asetat), ion H⁺ dan HCO₃⁻, 2) polisakarida dan 3) enzim fitase dan fosfatase (terutama fosfatase asam) (Victoria *et al.*, 2009). N-HSL disintesis dari protein pembawa acyl dengan S-adenosil-metionin oleh enzim N-HSL sintase, diteruskan oleh proses acylasi dan laktonisasi menghasilkan protein karier holo-acyl dan 5'-metil-tioadenosin, selanjutnya membentuk N-HSL (Watson *et al.*, 2002).

Simpulan

1. N-Acyl Homoserine Lactones (N-HSL) yang dihasilkan oleh BF sebagai signal QS terbanyak ialah Butanoyl (C₄) Homoserine Lactones.
2. Ekstrak akar tanaman padi, jagung, bambu, pisang dan kacang tanah dapat dijadikan sumber N-HSL sebagai signal QS dari BF.

Daftar Pustaka

- Balai Penelitian Tanah (BPT). 2005. *Petunjuk Teknis: Analisis Kimia Tanah, Tanaman, Air dan Pupuk*. Edisi Pertama. BPT, Balitbangtan Deptan, Bogor.
- Camara M, Williams P, Hardman A. 2002. Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. *Lancet Infectious Diseases* 2: 667-676.
- Hawkes CV, DeAngelis KM, Firestone MK. 2007. Root Interactions with Soil Microbial Communities and Processes. Pp. 1-30. In: Cordon, Z.G., and J.L. Whitbeck. (Eds.). *The Rhizosphere: An Ecological Perspective*. Academic Press, New York. 210p.
- Hosseinkhani B, Emtiazi G, Nahvi I. 2009. Analysis of phytase producing bacteria (*Pseudomonas* sp.) from poultry faeces and optimization of this enzyme production. *African Journal of Biotechnology*. 8(17): 4229-4232.
- Li, X, Fekete A, Englmann M, Gotz C, Rothballer M, Frommberger M, Buddrus K, Fekete J, Cai C, Schroder P, Hartman A, Chen G, Kopplin PS. 2006. Development and application of a method for the analysis of N-acylhomoserine lactones by solid-phase extraction and ultra high pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 1134: 186-193.
- Mehrvarz S, Chaichi MR. 2008. Effect of Phosphate Solubilizing Microorganisms and Phosphorus Chemical Fertilizer on Forage and Grain Quality of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 3(6): 855-860.
- Rani S, Kumar A, Malik AK, Kopplin PA. 2011. Occurrence of N-Acyl Homoserine Lactones in Extracts of Bacteria Strain of *Pseudomonas aeruginosa* and in Sputum Sample Evaluated by Gas Chromato-graphy–Mass Spectrometry. *American Journal of Analytical Chemistry* 2: 294-302.
- Rashid, M., S. Khalil, N. Ayub, S. Alam, and F. Latif. 2004. Organic Acids Production and Phosphate Solubilization by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) Under *in vitro* Conditions. *Pakistan*
- Susilowati A, Wahyudi AT, Lestari Y, Suwanto A, Wiyono S. 2011. Potential *Pseudomonas* Isolated from Soybean Rhizosphere as Biocontrol against Soilborne Phytopathogenic Fungi. *Hayati J. Biosci.* 18(2): 51-56.
- Tamad. 2012. Mekanisme dan efektifitas bakteri fosfat dalam pelepasan fosfor di Andisol. [Disertasi], UGM, Yogyakarta. 196 hal.
- Teplitski M, Mathesius U, Rumbaugh KP. 2011. Perception and Degradation of N-Acyl Homoserine Lactone Quorum Sensing Signals by Mammalian and Plant Cells. *Chem. Rev.* 111: 100-116.
- Thiel T. 1999. Science in the Real World: Microbes in Action. *Introduction to Bacterial*. 1-8 p. Department of Biology, University of Missouri-St. Louis.
- Tistama R, Widyastuti U, Sopandie D, Yokota A, Akashi K, Suharsono. 2012. Physiological and Biochemical Responses to Aluminium Stress in the Root of the Biodiesel Plant *Jatrofa curcas* L. *Hayati J. Biosci.* 19(1): 37-43.
- Victoria DE, Reyes LL, Benitez AC. 2009. Use of 16S rRNA Gene for Characterization of Phosphate-Solubilizing Bacterial Associated with Corn. *Rev. Fitotec. Mex.* 32(1): 31-37.
- Ward JP, King JR, Koerber AJ, Williams P, Croft JM, Sockett RE. 2001. Mathematical modelling of quorum sensing in bacteria. *IMA Journal of Mathematics Applied in Medicine and Biology* 18: 263-292.
- Watson WT, Minogue TD, Val DL, von Bodman SB, Churchill MEA. 2002. Structural Basis and Specificity of Acyl-Homoserine Lactone Signal Production in Bacteria Quorum Sensing. *Molecular Cell* 9: 685-694.